Ein Modell für die räumliche Trennung von Ferment-Substrat (Diastase-Stärke) in der Zelle

---

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der

Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Vereinigten Friedrichs-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Mendel Mühlbauer

aus Halle a. S.

Berlin 1930

Druck von L. Schumacher, N 4

Referent: Prof. Dr. Wertheimer.

Korreferent: Geh. Rat Prof. Dr. Abderhalden.

Sonderabdruck aus
„Fermentforschung“, Band 12.
(Verlag von Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien)

Die Frage, wieso in einer lebenden Zelle Substrat und das entsprechende Ferment nebeneinander vorkommen können, ohne daß es zu einem fortlaufenden rapiden Abbau kommt, wird wegen ihrer allgemeinen zellphysiologischen Bedeutung immer wieder gestellt. Der verhinderte Abbau des Substrats hängt eng mit dem normalen Zellgeschehen zusammen; nach Zerstörung der Zellstruktur oder überhaupt beim beginnenden Absterben fängt der Abbau an, die Autolyse setzt ein.

Wenn wir gleich auf unsere spezielle Fragestellung zurückkommen, so liegt hier seit den Untersuchungen von E. I. Lesser ein besonders wichtiges Teilgebiet des Fragekomplexes vor, welches für das Verständnis des Kohlehydrathaushaltes maßgebend sein kann. E. I. Lesser[1]) kommt durch klare Versuche zu dem Schluß, daß in der Zelle zwischen Diastase und ihrem Substrat eine räumliche Trennung bestehen muß, die durch Zerstörung der Zellstruktur aufgehoben werden kann, wodurch erst der rasche Abbau einsetzt. So fand speziell Lesser[2]) nach Zerstörung der morphologischen Struktur der Eizellen des Frosches durch Zerreiben mit Quarzsand oder durch Gefrieren der Zellen usw. ein rasches Auftreten des diastatischen Prozesses zu einer Zeit, zu der die betreffenden intakten Organe solche diastatischen Abbauvorgänge nicht zeigen würden.

Aber nicht nur durch Zerstörung der Zelle, sondern durch ganz wohldefinierte Einflüsse kann es zu einer Verminderung dieser räumlichen Trennung kommen, wie es E. I. Lesser[3]), Fröhlich und Pollak[4]) und Bang[5]) gezeigt haben. Besonders sei hier auf die neuen Arbeiten von

1) E. I. Lesser, Biochem. Zschr. **102**, 304 (1920); **119**, 108 (1921).
2) E. I. Lesser, Zschr. f. Biolog. **53**, 533 (1910); **54**, 1 (1910); **56**, 467 (1911).
3) E. I. Lesser, Biochem. Zschr. **102**, 304 (1920).
4) Fröhlich u. Pollak, Arch. f. exper. Patholog. u. Pharmakol. **77**, 265 (1914).
5) Bang, Biochem. Zschr. **56**, 153 (1913); **49**, 61 (1913).

Lesser[1]) an der Speicheldrüse verwiesen, von denen wir nur folgende interessante Ergebnisse hervorheben wollen. Er durchspülte die Parotis einer weißen Maus mit Ringer-Lösung und bestimmte u. a. den Diastase-Ausscheidungswert, der für unsere Darstellung hier am wichtigsten ist. Durch Zusatz von Adrenalin oder Alkoholen in bestimmten Konzentrationen erhielt er eine enorme Steigerung des Diastase-Ausscheidungswertes. Besonders wichtig ist, daß er durch isokapilläre Mengen von Alkoholen ungefähr die gleiche Menge von Diastase zur Mehrausscheidung brachte. Es ist ferner bemerkenswert, daß sämtliche Stoffe, die Diastase in der Parotis der weißen Maus freilegen, in der Leber zuckertreibend wirken.

Auf Grund dieser und seiner vorhergehenden Versuche[2]) kommt Lesser zu dem Schluß, daß diese räumliche Trennung, die zwischen der Diastase und dem Substrat vorhanden sein muß, herbeigeführt wird durch Adsorption der Diastase an Grenzflächen der Zellstruktur. Er stützt seine Annahme vor allen Dingen dadurch, daß Alkohole gemäß der Größe ihrer Oberflächenaktivität die Diastase aus ihrer Oberflächenbindung zum Teil zu verdrängen vermögen, wodurch dann freie Diastase auf ihr Substrat einwirken kann. Lesser mißt dieser reversiblen Adsorptionsbindung z. B. für die Frage des Diabetes mellitus eine grundlegende Bedeutung zu.

Schon Z. Unna[3]) suchte diese Ansicht Lessers in Modellversuchen zu erhärten. Im Anschluß an die bekannten Warburgschen Modellversuche der Zellatmung benutzte sie Tierkohle als Adsorbens, untersuchte in exakter Weise die adsorptive Bindung der Diastase an Tierkohle und kam zu dem Ergebnis, daß diese Bindung irreversibel sei. Neuerdings haben sich Przylecki und seine Schüler[4]) mit solchen Modellversuchen besonders im Hinblick, ob das Gesetz von der Massenwirkung auf Fermentreaktionen anwendbar sei, beschäftigt und fanden in bezug auf die Diastase im System: Diastase-Tierkohle-Glykogen, daß die Diastase praktisch vollständig, Dextrin oder Glykogen zu etwa 50 bis 75% adsorbiert seien. Diese Fixation an verschiedenen Teilen der adsorbierenden Oberfläche verursacht nach Przylecki die ganz erstaunliche Verminderung in der Schnelligkeit des Abbaus, die fast zum Stillstand führen kann. Wichtig ist hierbei, daß sie im Modell die Reversibilität der Adsorption unter Anwendung von Alkoholen nachweisen konnten, die eine erhebliche Elution vor allem des Substrats herbeiführen. In neuerer Zeit benutzte

1) Lesser, Biochem. Zschr. **184**, 125 (1927).
2) E. I. Lesser, Biochem. Zschr. **140**, 435 (1923). — Zipf, Ebenda **140**, 439 (1923).
3) Z. Unna, Biochem. Zschr. **172**, 392 (1926).
4) Przylecki, H. Niedzwieska, E. Majewski, Bioch. journ. **21**, 1025 (1927); **22**, 34 (1928); ferner Zschr. f. physiol. Chem. **178**, 19 (1928).

Przylecki[1]) als Adsorbens zum ersten Male schon eine Substanz, die für die lebende Zelle Bedeutung haben kann, nämlich Eiweiß.

Unserer Arbeit liegt die Aufgabe zugrunde, den Verhältnissen in der Zelle in bezug auf die räumliche Trennung von Diastase und Substrat durch Modellversuche noch näher zu kommen, als es bisher geschah, wobei wir den größten Wert darauf legten, daß diese Trennung durch physiologische Einwirkungen mehr oder weniger aufgehoben werden kann. Wir gingen dabei nicht von der Ansicht Lessers aus, daß eine Adsorption an eine strukturierte Oberfläche stattfindet, an die man ja die Oxydationsvorgänge verlegt hat, und die ja an sich noch problematisch ist; wir gingen von dem Gedanken aus, daß die Fermentteilchen und Substratteilchen von oberflächenaktiven Substanzen, wie sie in der Zelle vorkommen, umgrenzt werden. oder wir können auch direkt sagen, umhüllt werden, wobei gleichzeitig dem Substrat- und dem Fermentteilchen die gleiche elektrische Ladung der umgrenzenden oberflächenaktiven Substanzen auferlegt wird. Beides, die Umhüllung und die gleichmäßige elektrische Ladung, bewirken, daß Substrat- und Fermentteilchen in dauernder räumlicher Trennung verbleiben. Alle Eingriffe, welche die Umgrenzung und elektrische Ladung herabdrücken, müssen die räumliche Trennung entsprechend verändern, wodurch der Abbau des Substrats in mehr oder weniger großem Ausmaße eingeleitet werden kann. Aufgabe dieser Untersuchung ist es nun, diese Bedingungen, soweit sie physiologisch von Interesse sein können, festzulegen. Wir sind auch deshalb vom gewöhnlichen Modell, nämlich der strukturierten Oberfläche, abgewichen, weil wir mit den strukturierten Oberflächen, die uns als Modell zur Verfügung stehen, wie Tierkohle usw., die natürlichen Oberflächen doch zu wenig nachahmen können, und weil damit die Versuche keine befriedigende Analogie bieten.

Unsere Anordnung wird folgendermaßen gewählt: Als Ferment nehmen wir Pankreasdiastase, als Substrat Stärke und als physiologisch vorkommende oberflächenaktive Substanz zunächst fettsaure Salze, im speziellen Natriumoleinat. Über die Mengenverhältnisse und Methodik wird im experimentellen Teil berichtet. Wir haben zunächst das Beispiel mit Seife gewählt, weil hier schon wichtige Tatsachen bekannt sind, die als Grundlage zu unseren Versuchen dienen können. In wässeriger Lösung reiner Seifen können nebeneinander vorhanden sein: neutrale Seife, Fettsäureionen, Alkaliionen, evtl. freie Fettsäuren und freies Alkali. Die Seifenmizellen bestehen im wesentlichen aus neutraler Seife. Fettsäureionen und Alkaliionen sind in wechselnder Menge je nach Verdünnung

1) Przylecki, Biochem. journ. **24**, 188 (1930).

und Temperatur vorhanden. Sie bilden teilweise als Ladungsträger, bzw. als kompensierende Ionen, ebenfalls einen Anteil einer Seifenmizelle. Da alle wässerigen Seifenlösungen einer minimalen Hydrolyse von vornherein unterliegen, so sind freie Fettsäuren und freies Alkali als Produkte dieser Hydrolyse in verschwindend kleinen Mengen vorhanden[1]).

Die wässerigen Lösungen reiner Seifen zeigen eine relativ hohe elektrische Leitfähigkeit. Derartige Beobachtungen sprechen dafür, daß ihren elektrisch geladenen Kolloidteilchen eine starke Ladung zukommen muß, und zwar wandern die Teilchen bei der Überführung an die Anode. Die Ladung wird bewirkt durch die zahlreichen an der Oberfläche der Seifenmizellen haftenden Fettsäureteilchen. Die Kompensation dieser Ladung geschieht durch die Alkaliionen. Werden nun andere Teilchen in Seifenlösungen gebracht, so wird infolge der Fähigkeit der Seife, sich an Grenzflächen stark anzureichern, jedes Teilchen von einer Seifenschicht umzogen und jedes dieser Teilchen erhält dann durch sein Seifenhülle eine elektrische Aufladung. Engelmann[2]) konnte an Kaolinteilchen das eben betonte direkt nachweisen. Übrigens beruht ja, wie man heute annimmt, die Waschwirkung der Seifen auf der gleichen Eigenschaft. Wird eine Faser mit den daran haftenden Schmutzteilchen in eine Seifenlösung gebracht, so wird die Oberfläche des Schmutzteilchens ebenso wie die der Faser sofort dicht mit Seifenmizellen und den daran festhaftenden Fettsäureionen besetzt. Dadurch wird die gleiche elektrische Aufladung der Unterlage sowie des Schmutzteilchens bewirkt und beide Teile lassen sich leicht voneinander ablösen.

Übertragen wir diese Verhältnisse auf unser System: Stärke, Diastase und Seife, dann wäre von vornherein die Annahme zu machen, daß sowohl die Ferment- als auch die Substratteilchen von Seife besetzt und elektrisch aufgeladen würden; Substrat und Ferment würden also räumlich getrennt werden und können nicht aufeinander einwirken. In der Tat besteht nun eine ältere Untersuchung von Kende[3]), in der zunächst gezeigt wird, daß eine Reihe von Organsäften (besonders Pankreassaft) eine stark hemmende Wirkung auf das System Diastase-Stärke aufweisen. Er kann diesen Einfluß auf die hemmende Wirkung von fettsauren Salzen zurückführen. Bei unseren Untersuchungen ergab sich nun, daß Seife die Hydrolyse der Stärke durch Diastase in weitgehendstem Maße hemmt, wie aus dem hier als Beispiel angeführten Versuch vom 17. Oktober 1929 (siehe II. Teil) zu ersehen ist. Während nämlich der Abbau unter Ab-

1) Siehe über Seifen: M. H. Fischer, Kolloidchem. Beih. **15**, H. 1—4 (1922).
2) Engelmann, Inaugural-Dissertation 1922, Göttingen, siehe auch Spring, zit. bei R. Zsigmondy; Lehrbuch der Kolloidchemie, V. Aufl., II. Teil, Verlag Spamer in Leipzig.
3) Kende, Biochem. Zschr. **82**, 9 (1917).

wesenheit von Seife bei $p_H = 8{,}0$ in zwei Minuten voll beendet war (gelbe Farbe bei Zusatz von Jodjodkali) erhielten wir bei Anwesenheit von 0,6 ccm einer 0,5%igen Seifenlösung noch nach 80 Stunden keinen völligen Abbau (mit Jodjodkali mahagonibraune Farbe).

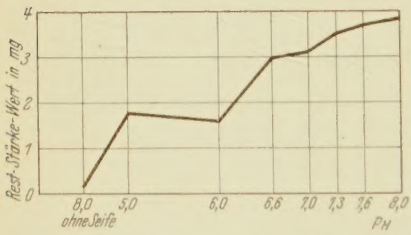
In weiteren Versuchen wollten wir ergründen, ob, wie wir angenommen haben, wirklich beide Teile, Substrat und Ferment, umhüllt werden und dadurch diese hemmende Wirkung erst zustandekommt. Es könnte ja auch so sein, daß nur der eine Teil umhüllt wird, während der andere frei bleibt. Nehmen wir an, daß Stärke allein von Seifenteilchen besetzt, das Ferment aber freigeblieben sei; dann dürfte bei einer Steigerung der Fermentkonzentration und bei einer gleichbleibenden Stärkemenge keinerlei Veränderung im Abbau eintreten. In der Tat zeigt sich aber, daß bei Steigerung der Fermentkonzentration ein viel früherer und zugleich viel stärkerer Abbau der Stärke eintritt. Dies beweist, daß die Seifenteilchen Stärke allein nicht einhüllen können, daß aber die Fermentteilchen umhüllt sein müssen, denn eine Erklärung kann nur so gegeben werden, daß zu einer gleichzeitigen Umhüllung des vermehrt zugegebenen Fermentes die sich gleichbleibende Seifenkonzentration nicht ausreicht; es bleiben Fermentteilchen frei oder sie werden nicht mehr so stark aufgeladen und diese können an die Stärketeilchen herangelangen.

Jetzt bleibt noch zu beweisen, daß auch die Stärke umhüllt ist. Die umgekehrte Beweisführung wie vorher ist nicht absolut stichhaltig. Aus diesem Grunde führen wir folgenden Versuch an, der nach unserer Ansicht die Tatsache der Umhüllung auch der Stärke und ihrer gleichzeitigen elektrischen Aufladung begründet. Es erweist sich nämlich, daß aus Leber dargestelltes und vielfach gereinigtes Glykogen in Gegenwart von Seife genau so rasch abgebaut wird, wie im Versuch ohne Seife, während zu gleicher Zeit unter denselben Konzentrationen die Stärke nach vielen Stunden noch nicht abgebaut ist. Wenn also Stärke nicht angegriffen wird, so muß, da wir bewiesen haben, daß das Ferment umhüllt ist, gleichzeitig auch die Stärke von den Seifenteilchen besetzt sein. Damit wäre die Annahme, daß Ferment- und Substratteilchen umschlossen sind und dadurch räumlich getrennt werden, bewiesen.

Nun darf man aber nicht annehmen, daß das gleiche, was wir für Stärke beweisen, für Glykogen nicht gilt. Es muß betont werden, daß wir das Glykogen in einem ganz anderen Zustand benutzten, als es physiologischerweise in der Zelle vorhanden ist. Mikroskopisch zeigt es sich ja schon, daß das Glykogen in deutlicher Körnchenform abgelagert ist, während wir es gewissermaßen „denaturiert“, in feinster Verteilung, angewandt haben. Die Stärke dagegen entspricht viel mehr dem Zustand in der Zelle.

Wir wollen zunächst sehen, bei welcher Konzentration Seife überhaupt noch einen hemmenden Einfluß auf den Abbau von Stärke durch Diastase ausübt. Nach einer Reihe von Versuchen können wir sagen, daß die Seife selbst in einer solch minimalen Konzentration von 1 : 1 Mill.% eben noch um ein geringes den normalen Verlauf des Abbaus verzögert.

Die räumliche Trennung zwischen Ferment und Substrat kann also auf diese Weise sehr einfach im Reagenzglas nachgeahmt werden; wenn unser Ansatz aber tatsächlich als Modell für die Vorgänge in der Zelle brauchbar sein soll, so muß die beschriebene Hemmung des Abbaus bis zu einem gewissen Grade reversibel gemacht werden können, und zwar durch Eingriffe, wie sie in der lebenden Zelle jeden Augenblick möglich sind. Wir denken dabei zunächst an die Ionenveränderungen, besonders Verschiebungen der Wasserstoffionenkonzentration, deswegen, weil bekannt ist, daß die Wasserstoffionenkonzentration einen bestimmten Einfluß auf den Abbau der Polysaccharide in der Zelle[1]) hat. Wir haben unsere Modellversuche bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen durchgeführt, und zwar sowohl jene Versuche, die nach kurzer Zeit abgebrochen wurden, und in denen wir den zurückgebliebenen Rest an Stärke quantitativ bestimmten, als auch jene Versuche, die wir tagelang beobachteten (Phosphatpuffer $p_H = 5{,}0$; 6,0; 6,6; 7,0; 7,3; 7,6; 8,0). So besagt z. B. unser Versuch vom 9. Oktober 1929, der hier in Kurvenform dargestellt ist, daß die Hemmung durch die Wasserstoffionenkonzentration deutlich beeinflußbar ist, nämlich so, daß nach der sauren Seite hin eine offensichtliche Zurückdrängung der Hemmung erfolgt (Kurve 1). (Bei $p_H = 5{,}0$ tritt wahrscheinlich eine direkte Wirkung auf das Ferment ein.) Wir legten den größten Wert darauf, daß auch bei Veränderungen der $[H]^+$ Konzentration innerhalb der physiologischen Breite in einer Reihe von $p_H = 7{,}0$; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5 immer klare und gut meßbare Verschiedenheiten auftraten, die sich in die eben gemachte wichtige Feststellung einreihen. Dies wird deutlich in den etwas gröberen Versuchen, wobei wir den Ablauf der Abbaureaktion über Tage hin ver-

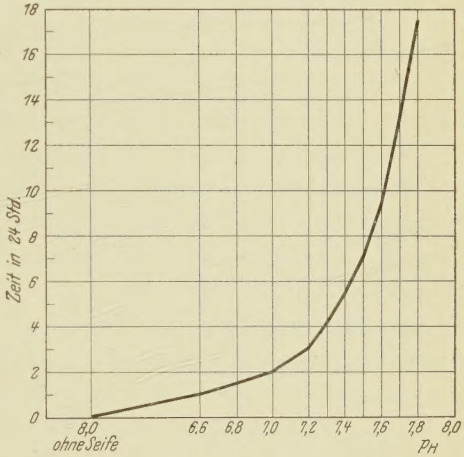


Versuch vom 9. X. 1929.
Kurve 1.

1) Elias, Erg. d. inn. Mediz. u. Kindhlk. **25**, 192 (1924). — Derselbe, W. m. W. **43**, (1928). — E. I. Lesser, Biochem. Zschr. **52**, 471 (1913); **119**, 108 (1921). — Macleod and M. E. Fulk, Americ. journ. of physiol. **42**, H. 2, 193 (1917). — Derselbe, Journ. of exp. biol. a. med. **13**, 169 (1916). — Rona u. Neukirch, Arch. f. d. ges. Physiol. S. 148 u. 273 (1912). — Rona u. Wilenko, Biochem. Zschr. **59**, 173 (1914); **62**, 1 (1914).

folgten, also in den sogenannten „Zeitversuchen“, wie wir sie der Einfachheit halber nennen wollen, von denen einer hier zum besseren Verständnis als Beispiel wieder am besten in Kurvenform angeführt sei (Versuch vom 12. März 1930). Wir nehmen hier benachbarte Werte von $p_H = 6{,}8$ bis 8,0, wie oben angegeben, und können feststellen, wie selbst Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentrationen in durchaus physiologischer Breite wie $p_H = 7{,}3$ und 7,2 im System Diastase-Seife-Stärke einen solchen Einfluß ausüben, daß der Abbau im letzteren Falle gegenüber dem von 7,3 um viele Stunden beschleunigt wird (Kurve 2).

Sehr schön ist auch zu beobachten, wie die einzelnen Unterschiede sich bei geeigneter Unterbrechung in einer prächtigen Farbenskala unter den gegebenen Umständen widerspiegeln. Wir setzen dabei einen Versuch an mit den oben angegebenen p_H-Werten von 6,8 bis 8,0, brechen den Versuch nach einer gewissen Zeit ab und geben zu jeder Probe einen Tropfen Jodjodkali; man sieht dann in ganz deutlichen Abstufungen eine Farbenskala — je nach dem Zeitpunkt natürlich — vom Gelb ins Blau mit ganz ausgeprägten Schattierungen von einem p_H zum anderen. Übrigens fällt bei diesen Versuchen auf, daß je weiter wir in den alkalischen Bereich kommen, der Abstand im Endpunkt des Abbaus von einem p_H zum anderen immer größer wird.



Endpunkt: Klares Gelb mit Jodjodkali.
Versuch vom 12. III. 1930.

Kurve 2.

Die Erklärung der Wasserstoffionenwirkung in unserem System ist so zu geben, daß je weiter man nach der sauren Seite vorrückt, um so unbeständiger die Seifenlösungen werden. Wir können diese Veränderungen aus Kurven von Jarisch[1]) ersehen, in denen er einfach die Veränderung der Oberflächenspannung der Seifen unter Wirkung der verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen mißt; nimmt aber die Oberflächenspannung ab, so muß auch die Besetzung der Teilchen geringer werden. Wichtig ist, daß sich physiologisch mögliche Änderungen der $[H]^+$ Konzentrationen so deutlich bemerkbar machen.

1) A. Jarisch, Pflüg. Arch. **194**, 337 (1922).

Wir können damit jedenfalls zusammenfassend betonen, daß sich modellmäßig zeigen läßt, daß in einer Lösung Ferment und Substrat nebeneinander bestehen können, und trotzdem der Abbau außerordentlich minimal ist, daß aber durch geringe Veränderungen in physiologischer Breite, wie wir hier an Beispielen der Veränderungen der $[H]^+$ Konzentrationen gezeigt haben, eine teilweise Aufhebung der räumlichen Trennung eintritt und der Abbau in die Wege geleitet werden kann. Die Versuche z. B. mit Jodjodkali als Nachweis der zurückgebliebenen Stärke sind so einfach ausführbar, und die Unterschiede sind nach kurzer Zeit so deutlich zu erkennen, daß sie sich leicht als Vorlesungsversuche oder Versuche im Kurs durchführen lassen. Mit anderen Worten: die räumliche Trennung und ihre Aufhebung durch physiologische Mittel ist durch die beschriebenen Versuche modellmäßig gezeigt.

Die Versuche geben auch einen interessanten Hinweis dafür, daß die Wasserstoffionenkonzentration in einem auf eine bestimmte Weise veränderten Milieu ganz anders wirken kann, als wenn wir einfach Ferment und Substrat aufeinander einwirken lassen. Benutzen wir z. B. unsere Pankreasdiastase und Stärke ohne Seife, dann sahen wir bei unseren Versuchsbedingungen, daß eine Veränderung der $[H]^+$ Konzentrationen im Bereich von 6,8 bis 8,0 einen kaum meßbaren Einfluß auf den Abbau ausübte. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration in demselben Bereich wird aber außerordentlich scharf, sobald in das System Seife hinzukommt.

Andere Ionenwirkungen, die eine Veränderung der Umhüllung und dadurch der elektrischen Ladung bewirken, fanden wir nicht, da die Förderung zum Beispiel durch NaCl und in viel geringerem Maße durch Na_2SO_4 auf einen direkten Einfluß auf das Ferment zurückzuführen ist. Etwas anderes ist es mit der Wirkung des Ca-Ions. Hier ist die Ursache des raschen Abbaus auch bei Anwesenheit von Seife darin zu suchen, daß diese durch das Ca gefällt wird und somit als Umhüllungsmittel nun nicht mehr in Frage kommt (Versuche siehe II. Teil).

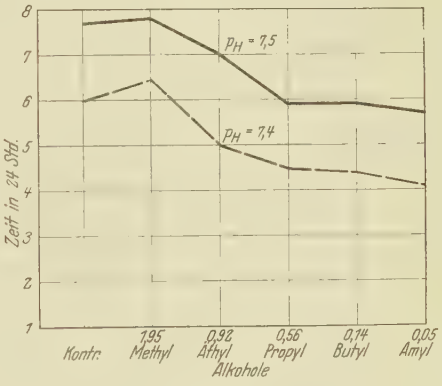
Uns interessierte weiter die Frage, wie sich unser System verhält, wenn noch Eiweiß — in unserem Falle Serum — gegenwärtig ist. Dabei zeigte sich, daß unter Einfluß des Serums die Hemmung im System Diastase-Seife-Stärke deutlich abgeschwächt wird. Der oben geschilderte Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration bleibt hierbei in gleicher Weise erhalten; das Eiweiß stellt vielmehr gewissermaßen eine Konstante dar, die eine sich gleichbleibende Beschleunigung des Abbaus verleiht. Die Erklärung ist darin zu suchen, daß, wie Jarisch[1]) gezeigt hat, Seifen

1) A. Jarisch, Pflüg. Arch. **194**, 337 (1922).

bei Zusammenbringen mit Serum hydrolytisch in Fettsäure und Alkali zerfallen: die Fettsäuren verbinden sich mit Eiweiß zu einer klaren Lösung und lassen sich aus dieser weder durch Säure noch durch $CaCl_2$ fällen. W. Ostwald[1]) sagt ja direkt: „Seifen allein werden schon bei Berührung mit großen Oberflächen, wie die Serumkolloide sie darstellen, zerlegt."

Lesser legt für seine Erklärungsweise den größten Wert darauf, daß die räumliche Trennung durch Alkohole in bestimmter Konzentration verringert werden kann. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Bindung der Ferment- und Substratteilchen an strukturierten Oberflächen stattfinden müßte, wobei dann die Aufhebung der Trennung dadurch zustandekommt, daß die Alkohole vermöge ihrer Oberflächenspannung die adsorbierten Teile verdrängen. Können wir nun in unserem System eine entsprechende Alkoholwirkung nachweisen? In der Tat konnten wir feststellen, daß die Alkohole in unseren Versuchen eine teilweise Aufhebung der Hemmung erzielen (Kurve 3 und 4). Diese Wirkung der

Versuch vom 9. IV. 1930.
Kurve 3.



Versuche vom 1. IV. und 5. IV. 1930.
Kurve 4.

Alkohole kann aber durch unser Modell erklärt werden. Die Alkohole brauchen nicht infolge ihrer Eigenschaft der Oberflächenspannung adsorbierte Teile an strukturierten Oberflächen zu verdrängen, sondern sie vermögen eben durch ihre Oberflächenaktivität zum großen Teil die Einhüllung der Stärke- und Fermentteilchen durch Seife, somit auch die gleiche elektrische Aufladung zu verhindern, indem sie sich gewissermaßen zwischen Gegenstand der Umhüllung und Umhüllungsmittel stellen.

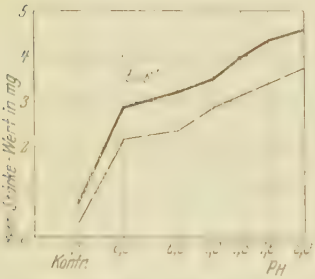
Wenn in einigen Versuchen mit isokapillären Mengen die Probe mit Methylalkohol eine Hemmung noch gegenüber der Kontrolle aufweist, so ist das auf die bekannte Tatsache zurückzuführen, daß Alkohole in zu

1) W. Ostwald, zit. von Jarisch, Pflüg. Arch. **194**, 337 (1922).

großen Mengen die Fermente vergiften, also unwirksam machen können. Um die Isokapillarität zu erhalten, werden die Konzentrationen des Methylalkohols hier zu groß. Es liegt dann ein Widerstreit vor. Einerseits eine Schädigung des Ferments und daher die mehr hemmende Komponente, andererseits die fördernde Wirkung, nämlich durch die Fähigkeit, die Einhüllung der Stärke- und Fermentteilchen durch die Seife zu verhindern, die hier im Verhältnis geringer ist. Unsere Zahlen bedeuten also die Resultante dieser zwei verschiedenen Wirkungen.

Interessant war für uns die Frage, ob die Inkrete, die im Kohlehydratstoffwechsel eine Rolle spielen, besonders Adrenalin, Thyroxin, Insulin und das Secalegift Ergotamin sich auch in unseren Modellversuchen als wirksam erweisen (Versuche vom 29. März 1930). Es zeigt sich jedoch kein sicher verwertbares Ergebnis.

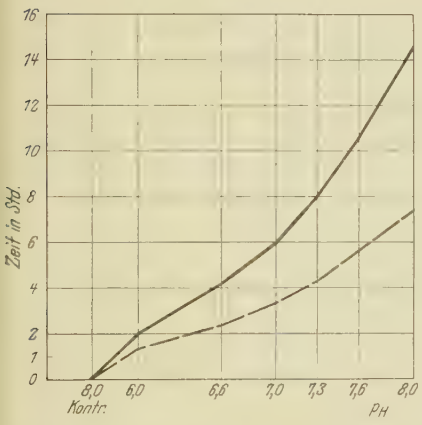
Wir sehen nun, daß Seife eine ganz bestimmte Wirkung im System Diastase-Stärke ausübt im Sinne einer starken Hemmung des Abbaus durch eine Umhüllung der einzelnen Teilchen beider Substanzen und einer gleichzeitigen elektrischen Aufladung, somit eine räumliche Trennung verursachend. Wir erkennen ferner, daß diese räumliche Trennung durch Ionenwirkung und durch oberflächenaktive Stoffe wie Alkohol zum Teil aufhebbar ist. Wir suchten nun noch nach anderen in der Leber vorhandenen Substanzen, die eine gleiche oder ähnliche Wirkung haben. In erster Linie dachten wir dabei an oberflächenaktive Substanzen wie Lecithin, gallensaure Salze und Cholesterin, die konstante Bestandteile der Leberzellen sind.



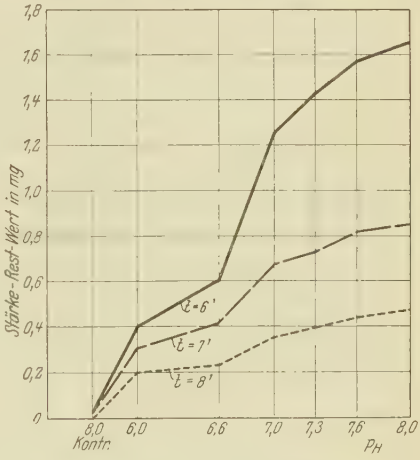
Mit Lecithol (Riedel) ——
Emulsion nach Porges
Lecithin (Merck) - - - - -
2 Versuche vom 16. X. 1929.
Kurve 5.

Ersetzen wir Seife in unserem System beispielsweise durch Lecithin, so finden wir ganz ähnliche Verhältnisse. Wir erkennen, daß auch hier der Abbau der Stärke eine bedeutende Verlangsamung erfährt, daß auch der geschilderte Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration im gleichen Maße Gültigkeit bewahrt, die aus dem Versuche vom 24. Oktober 1929 zu ersehen ist, der als Beispiel hier angeführt sei (Kurve 5). Im ganzen ist jedoch die Hemmung durch Lecithin, die sich ja ganz klar aus den Versuchen (siehe II. Teil) ergibt, nicht ganz so intensiv, wie durch Seife. Auch die Grenze der hemmenden Wirkung liegt bei Lecithin nicht so tief wie bei Seife, es wird nämlich der Abbau bei einer Konzentration von $^1/_{200\,000}$% eben noch in geringem Maße aufgehalten. Die Ursache der Beeinflussung des Abbaus ist auch hier in einer Umhüllung und gleichzeitigen elektrischen Aufladung zu suchen.

Auch die gallensauren Salze wie Natrium choleinicum und Natrium cholalicum vermögen nach unseren Ergebnissen eine noch sehr deutliche Hemmung des Abbaus von Stärke durch Diastase zu bewirken. Denn während beispielsweise im Versuch vom 26. Oktober 1929 mit Natrium choleinicum die Kontrolle bei einem p_H von 8,0 in etwa 45 Sekunden völlig abgebaut ist, so wird derselbe völlige Abbau bei Gegenwart des gallensauren Salzes erst nach $14^1/_2$ Stunden erreicht (Kurve 6). Daß auch hier wieder der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration von hervorragender Wirkung ist, kann leicht aus den beigegebenen Kurven, die das Ergebnis einiger Versuche wiedergeben, ersehen werden (Kurve 7).



Endpunkt: Klares Gelb mit Jodjodkali
Versuch v. 18. X. 29 m. Natr. choleinic. ——
Versuch v. 26. X. 29 m. Natr. cholalic. - - - - -
Kurve 6.

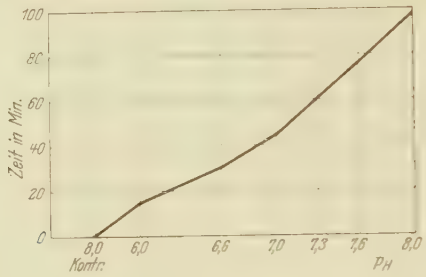


3 Versuche
vom 12. und 18. X. 1929
mit Natr. choleinicum
Kurve 7.

Es ist hierbei jedoch festzustellen, daß im ganzen der Abbau gegenüber dem unter Einwirkung von Seife oder Lecithin wesentlich beschleunigter vor sich geht. Ganz ähnlich verhält es sich mit Natrium cholalicum, das wiederum nicht ganz so stark wirksam erscheint wie Natrium choleinicum (siehe auch Kurve 6).

Noch schneller verläuft der Abbau unter Einfluß von Cholesterin. Die Hemmung ist lange nicht so groß wie bei den bis jetzt angeführten Substanzen, jedoch noch sehr deutlich. Unter Anwesenheit von Cholesterin dauert der völlige Abbau von Stärke bei einem p_H von 8,0 immerhin noch über $1^1/_2$ Stunden gegenüber etwa 45 Sekunden bei der Kontrolle. Auf jeden Fall muß auch dem Cholesterin die Fähigkeit zugeschrieben werden, Ferment und Substrat im System Diastase-Stärke räumlich zu trennen (Kurve 8).

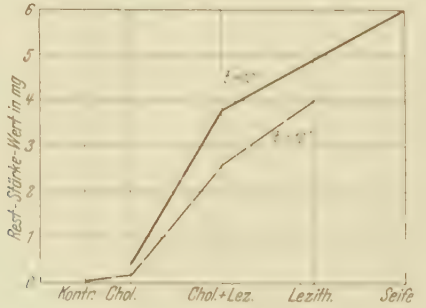
Schließlich interessiert uns noch das Zusammenwirken von Lecithin und Cholesterin, wobei von kolloidchemischen Gesichtspunkten aus eine teilweise Aufhebung der Lecithinwirkung zu erwarten war, eine antagonistische Wirkung, die aus vielen biologischen und Modellversuchen



Versuch mit Cholesterinzusatz.
Versuch vom 23. X. 1929
Kurve 8.

bereits bekannt ist. Unsere Versuche bestätigten diese Annahme. Sie zeigen, daß der Abbau viel früher geschieht als unter Lecithinwirkung, aber später als bei bloßer Anwesenheit von Cholesterin. Kurve 9.

Nach diesen Erkenntnissen, am Modell gewonnen, gingen wir daran, die Wirkungen der Wasserstoffionen innerhalb der Zelle zu studieren. Wir nahmen hierzu ganze und zerschnittene Leber- und Muskelstücke,



Versuch vom 8. IV. 1930.
Kurve 9.

ließen bestimmte Säuren und Alkalien in Abstufungen einwirken, um möglichst gleiche Verhältnisse zu bekommen. Die Resultate fielen jedoch so verschieden und unregelmäßig aus, daß wir bestimmte Schlüsse nicht ziehen können. Dagegen sei hier auf die Versuche von H. Elias und St. Weiß[1] an Froscheiern hingewiesen, die finden konnten, daß bei

1) H. Elias u. St. Weiß, W. m. W. **43**, (1928).

steigender $[H]^+$ Konzentration in der umgebenden Flüssigkeit der Glykogengehalt der Froscheier allmählich abnimmt.

Wie lassen sich die Modellversuche mit den Erfahrungen, die am Organismus oder am herausgeschnittenen Organ gewonnen wurden, in Einklang bringen? Daß von vornherein eine räumliche Trennung vorhanden sein muß, wird genügend von Lesser bewiesen und wird auch im Modellversuch klar dargestellt. Die Aufhebung der räumlichen Trennung fanden wir im Modell vor allem gegeben durch die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration nach der sauren Seite, und es ist ja durch vielfache Tatsachen gestützt, daß im lebenden Organismus oder im überlebenden Organ namentlich bei der Leber durch Verschiebungen nach der sauren Seite eine Glykogenolyse einsetzt. Wir erinnern hier besonders an die zusammenfassende Arbeit von H. Elias[1]), der ja von jeher auf den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Glykogenolyse hingewiesen hat. Betont muß natürlich werden, daß nicht unbedingt notwendig ist, daß die $[H]^+$-Konzentration im Blut des Organismus sich verändert. Eine Verringerung der Alkalireserve allein kann sehr leicht die Bedingungen schaffen, die dazu führen, daß sich in den Zellen bei dem geringsten Anstoß die $[H]^+$-Konzentration verschiebt und die Beobachtungen, die Macleod[2]) z. B. über die Erstickungsglykosurie machte, sprechen durchaus dafür. Wir verweisen hierbei auf die Funktion des Atemzentrums, bei dem auch eine zelluläre Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration die Regulation stark beeinflußt.

Mit der Zerstörung der morphologischen Struktur hat Lesser vor allen Dingen seine Ansicht über die räumliche Trennung gestützt. Nach unserem Modell müßte diese physiologische Schranke nicht allein durch einen mechanischen Eingriff aufgehoben oder besser verringert werden, sondern vor allem auch dadurch, daß sich die Wasserstoffionenkonzentration bei Zerstörung des Gewebes nach der sauren Seite verschiebt. Und sicherlich ist das „postmortale Durchgängigwerden der Trennungswände“ bei Zerstörung der Struktur nicht allein für den erhöhten Glykogenabbau maßgebend, wie es Lesser[3]), Hofmeister[4]) und Spiro[5]) annehmen. Denn schon Pary und Bywaters[6]) machten die Beobachtung, daß bei dem postmortalen Glykogenabbau sich anhäufende Säuren eine Rolle spielen; sie konnten auch den postmortalen Glykogenabbau durch Sodainfusion hemmen. Unsere Anschauung, die wir uns auf Grund der

1) H. Elias, Erg. d. inn. Med. u. Kindhlk. **25**, 192 (1924).
2) Macleod, Americ. journ. of physiol. **23**, 279 (1909).
3) E. I. Lesser, Zschr. f. Biolog. **53**, 533 (1910); **54**, 1 (1910); **56**, 467 (1911).
4) Hofmeister, zit. von Elias, Zschr. f. Kindhlk. u. inn. Med. **25**, 192 (1924).
5) Spiro, Kl. W. **1**, 1199 (1922).
6) Pary and Bywaters, Journ. of physiol. **41**, 168 (1911).

Modelle bilden konnten, besitzt demnach mindestens ein hohes Maß von Wahrscheinlichkeit.

Es ist gewiß, daß im normalen Stoffwechsel ein Einfluß von Säure und Alkali auf die Glykogenmobilisierung besteht[1]. Schon lange ist es bekannt, daß durch Einführung von Säuren (und auch bei Erstickung) eine Glykogenolyse eintritt, wogegen freilich noch eingewendet werden kann, daß die Glykogenolyse von dem Zuckerzentrum ausgehen kann. Aber bei Durchspülung des überlebenden Organs mit Lösungen, die schwachsauer sind [Elias, Lesser, Fröhlich und Pollak, Morawitz[2]), Underhill[3]) und Murlin[4]], wurde von allen Autoren eine Glykogenolyse gefunden. Zugleich fanden dieselben Forscher bei Einverleibung schwacher Säuren am Kaninchen Hyperglykämie und Glykosurie und Abnahme der Glykogenbestände in der Leber. Underhill[5]) dagegen bei Gabe von Alkali Hypoglykämie, so daß man wohl mit höchster Wahrscheinlichkeit annehmen darf, daß auch im Gesamtorganismus die Glykogenolyse durch Säuerung begünstigt wird. Die Beobachtungen und Schlüsse von Hofmeister[6]) und Elias[7]) über Hungerdiabetes von David und Bache[8]) und vor allem von Macleod[9]) über Erstickungsglykosurie sprechen so sehr dafür, daß Elias zumindest für den normalen Stoffwechsel den Einfluß des Säurebasehaushaltes auf die Glykogenmobilisierung für sicher hinstellt.

Ob für den pathologischen Kohlehydratstoffwechsel die Verschiebungen der Wasserstoffionen die gleiche oder ähnliche Rolle spielen, ist nicht mit Sicherheit geklärt. Nach Langenfeld[10]) führt beim experimentellen Pankreasdiabetes an dem nicht vollkommen pankreasfreien Hund eine Steigerung der Wasserstoffionenkonzentration im Pfortaderblut zu einer intensiven Glykogenolyse. Sodadosen setzen ferner beim pankreaslosen Hund die Glykosurie herab. Beim Diabetes mellitus erhielten schon 1902 Bendix und Bickel[11]), ebenso Underhill[12]) und Toenissen[13])

1) Elias, Erg. d. inn. Med. u. Kindhlk. **25**, 192 (1924).
2) Morawitz, Verhandl. d. Ges. dtsch. Naturf. u. Ärzte 1911. Referat: Inn. Sekretion, S. 12.
3) Underhill, Journ. of biolog. chem. **1**, 113 (1905).
4) Murlin u. Mitarbeiter, Journ. of biolog. chem. **24**, 25 (1916); **28**, 289 (1916).
5) Underhill and Mac D. Louise, Journ. of biolog. chem. **29**, 227 (1917); **25**, 463 (1916).
6) Hofmeister, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **26**, 355 (1890).
7) Elias, Ebenda.
8) David, M. Bache u. W. Auel, M. m W. **61**, I, 868 (1914).
9) Macleod, Americ. journ. of physiol. **49**, 126 (1918/19).
10) Langenfeld, I. journ. of biolog. chem. **46**, 387 (1921). — Derselbe, Acta med. skandinav. **53**, (1920), zit. nach Langenfeld I.
11) Bendix u. Bickel, D. m. W. **28**, 3 (1902).
12) Underhill and Borgest, Journ. of biolog. chem. **27**, H. 1, 161 (1916).
13) E. Toenissen, Verh. d. dtsch. Ges. f. inn. Med. S. 270 (1921).

zeitweilige Abnahme der Zuckerausscheidung nach Alkalizufuhr. Jedenfalls kommt nach allem Elias zu dem Schluß, daß für den Ablauf der experimentellen Glykosurie die Veränderung in der Wasserstoffionenkonzentration sicher von großem, wenn nicht von entscheidendem Einfluß ist.

Bei Zugabe von Adrenalin fanden wir in unserem Modell keine Wirkung. Es ist aber zu überlegen, ob Adrenalin in der Zelle nicht zunächst eine Verschiebung der $[H]^+$-Konzentration nach der sauren Seite hin verursacht, wofür schon alte Beobachtungen sprechen. Es sei jedoch gleich auf Versuche von Gottschalk und Pohle[1]) hingewiesen, die eine „lokale Acidosis" sehr wahrscheinlich machen. Nach Adrenalininjektion fanden sie mittels Gaskette eine deutliche Steigerung der Wasserstoffionenkonzentration im Blut der Vena portae und noch stärker im Blut der Vena hepatica. Dies spricht für eine lokale im Splanchnikusgebiet beginnende und in der Leber den Höhepunkt erreichende Anhäufung von Säuren.

Bekräftigt wird die Annahme ferner durch die bekannte Tatsache, daß die Adrenalinwirkung durch Säure, ja schon durch eine saure Nahrung unterstützt, durch Alkali und durch eine alkalienreiche Ernährung vermindert wird. Auch Elias und Sammartino[2]) bekamen bei Durchspülung der Schildkrötenleber mit leicht alkalischer Adrenalin-Ringerlösung eine nur geringe Zuckerausschwemmung, ebenso wie Underhill[3]) den Blutzuckeranstieg nach Adrenalin durch intravenöse Sodainfusion zum Abfall bringen konnte.

Mag man auch in manchen Punkten mit den Anschauungen von Elias nicht übereinstimmen, so wird man doch auf jeden Fall zugeben müssen, daß der Wasserstoffionenkonzentration, besonders lokal in der Leber, für die Glykogenolyse eine besondere Bedeutung zukommt. Und gerade das wird ja in unseren Modellversuchen gut gezeigt, daß durch minimalste Veränderungen der $[H]^+$-Konzentration nach der sauren Seite die räumliche Trennung vermindert wird, während nach der Lesserschen Auffassung die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration schwieriger zu zeigen wäre. Eine Veränderung nach der alkalischen Seite müßte dann die räumliche Trennung stabilisieren. Nur kurz sei hierbei darauf hingewiesen, daß nach Insulininjektion eine Vermehrung der Alkalität in Muskeln und der Leber gefunden wurde[4]).

---

1) Gottschalk u. Pohle, Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. **95**, 64 (1922).
2) Elias u. Sammartino, Biochem. Zschr. **117**, H. 1, 10 (1921).
3) Underhill, Journ. of biol. chem. **25**, 463 (1916); **27**, 1 (1916); **29**, 227 (1917).
4) Siehe z. B. Kuhn u. Baur, M. m. W. 1924, S. 187, 169 u. 54.

Zusammenfassung.

1. Die in der lebenden Zelle bestehende Trennung zwischen Ferment und Substrat und die unter bestimmten Bedingungen erfolgende mehr oder weniger starke Aufhebung dieser Trennung soll am Beispiel Diastase-Stärke durch ein Modell dargestellt werden. Diese räumliche Trennung wird im Modell bewirkt durch oberflächenaktive, in der Zelle vorkommende Stoffe wie oleinsaures Natrium, Lecithin, gallensaure Salze und Cholesterin. Am Beispiel des oleinsauren Natriums wird gezeigt, daß die räumliche Trennung dadurch zustandekommt, daß es vermöge seiner Oberflächenaktivität Ferment- und Substratteilchen umgibt und ihnen dadurch eine bestimmte gleiche elektrische Ladung verleiht. Die räumliche Trennung wird also in diesem Modell bewirkt durch eine Umhüllung und gleichmäßige elektrische Aufladung von Ferment und Substrat durch eine oberflächenaktive Substanz.

2. Die zweite Forderung an das Modell ist die, daß die Trennung durch physiologische Mittel reversibel gemacht werden kann. Das geschieht am besten durch Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration. Ganz geringe Verschiebungen nach der sauren Seite, die durchaus im Bereich des physiologischen liegen, bewirken bereits deutlich eine Abnahme der Trennung, nach der alkalischen Seite eine Stabilisierung der Trennung.

3. Auch durch andere oberflächenaktive Stoffe ist im Modell die räumliche Trennung reversibel zu gestalten, wie es am Beispiel der Alkohole in isokapillären Mengen gezeigt wird.

4. Die Anwendung des Modells auf Verhältnisse in der Leberzelle wird besprochen.

Experimenteller Teil.

A. Versuchsanordnung.

Als Ferment wird der Glyzerinextrakt getrockneter Pankreasdrüse in Verdünnung $^1/_{50}$ benutzt, der nach $^1/_2$ bis 1 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur filtriert wird. Für die Versuche werden je 0,3 ccm des Filtrats, die nochmals mit der gleichen Menge destillierten Wassers verdünnt werden, genommen; diese Menge ist für die Versuche am geeignetsten. Als Substrat wird 1% lösliche Stärke (Kahlbaum), und zwar je 2 ccm pro Versuch verwandt. Vom Natrium oleinicum (Kahlbaum) in einer $^1/_{10}$%igen Lösung werden 0,6 ccm benutzt. Zur Pufferung werden 2 ccm Phosphatpuffer zum Versuch zugesetzt.

Die Grundanordnung ist also folgende:

2 ccm Stärkelösung (1%)
2 ccm Pufferlösung
0,3 ccm mit der gleichen Menge H_2O verdünnten Ferments (vom Glyzerinextrakt 1 : 50)
0,6 ccm Seifenlösung ($^1/_2$%).

Diese Grundanordnung wird je nach Gebrauch in der doppelten oder dreifachen Menge angesetzt.

B. Gang der Untersuchung.

1. Eine bestimmte Anzahl von Zentrifugengläsern entsprechend der zur Untersuchung benutzten verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen (8,0; 7,6; 73; 7,0; 6,6; 6,0; 5,0) zuzüglich einer Kontrolle ohne Seife werden laut Grundanordnung angesetzt. Man läßt eine bestimmte Zeit (10′) bei Zimmertemperatur stehen, worauf der Versuch unterbrochen wird, indem mit je 5 ccm Alkohol unter sofortigem Umschütteln die übrig gebliebene Stärke gefällt wird. Nach weiterem Stehen mit dem Alkohol, bis sich die Stärke abgesetzt hat, wird unter sorgfältiger Waschung mit 66% und 96% Alkohol zentrifugiert. Die abgesetzte Stärke wird nun durch Zugabe einer genügenden Menge von 2,2%iger Salzsäure unter Kochen gespalten. Darauf wird mit KOH neutralisiert und der Zucker nach Folin-Wu bestimmt.

2. Eine zweite Art der Versuchsanordnung über lange Zeit ist folgende. Von dem beschriebenen Ansatz wird von Zeit zu Zeit eine Probe (1 ccm) entnommen, 1 Tropfen Jodjodkali zugesetzt und die Farbe kontrolliert. Als Endpunkt des Versuchs wird gewöhnlich das erste Auftreten der klaren gelben Farbe gewählt, die uns anzeigt, daß der Stärkeabbau vollständig ist. Um die Versuche nicht zu lange auszudehnen, kann man auch das Auftreten der reinen Dextrinfarbe (Mahagonibraun) als Endpunkt wählen. Die Unterschiede in den einzelnen Versuchen sind so stark, daß diese einfache Anordnung ausreichend ist.

C. Vorversuche.

I. Wirkung der Seife im System Diastase-Stärke.

Beispiel: Versuch vom 3. 10. 1929. Ansatz wie oben ohne Puffer. Dazu eine Kontrolle ohne Seife. Nach 10′ Zusatz Jodjodkali: Kontrolle gelb, Grundanordnung blau.

Die Seife übt also im Modell einen hemmenden Einfluß auf den Abbau der Stärke aus.

II. Grenze der hemmenden Wirkung durch Seife.

Versuche vom 23. 10. 1929. Ansatz laut Grundanordnung ohne Puffer. Die Seife (0,5 ccm) in verschiedenen Verdünnungen, nämlich

1. 100 fach	4. 50 000 fach	7. 1 000 000 fach
2. 1 000 „	5. 100 000 „	8. Kontrolle
3. 10 000 „	6. 500 000 „	ohne Seife.

$t = 1'$.

Nach einer Minute Zusatz von je ein Tropfen Jodjodkali.

1. blau	4. hellgrün	7. gelb
2. blaugrün	5. grüngelb	8. gelb
3. dunkelgrün	6. gelb Spur grün	

Andere Versuche ergaben dasselbe. 0,5 ccm einer 500 000 fach verdünnten 0,5%igen Lösung von Natrium oleinicum vermag eben noch eine geringe Hemmung im Abbau der Stärke hervorzurufen.

III. Wesen der Hemmung.

a) Beweis, daß Ferment umhüllt wird.

Versuch vom 18. 10. 1929.

Ansatz: 0,5 ccm Stärke 1%, 0,6 ccm Seife 0,5%,
5,0 ccm unseres Ferments in den Verdünnungen: 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000.
Dazu Kontrolle ohne Seife mit Fermentverdünnung 1:1000.

18. X.	16^{15}	Verdünnung 1:1	1:10	1:100	1:1000	Kontrolle
19. X.	9h	gelb	gelb	rotviolett	blauviolett	gelb
20. X.	9h	—	—	gelb	braungelb	—

Daraus muß geschlossen werden, daß das Ferment umhüllt ist.

b) Beweis, daß Stärke umhüllt ist.

Ansatz: 1. 2 ccm Stärke 1%, 0,3 ccm Ferment, 0,6 ccm Seife 0,5%.
2. 2 ccm Glykogen (vielfach gereinigt), 0,3 ccm Ferment, 0,6 ccm Seife.
3. Kontrolle: 2 ccm Glykogen, 0,3 ccm Ferment.
$t = 2'$.

Nach 2 Minuten Zusatz von 1 Tropfen Jodjodkali: 1. blau, 2. gelb, 3. gelb. Mehrere Versuche derselben Art, auch mit Stärke anstelle Glykogen in der Kontrolle verliefen genau so.

Die Ergebnisse beweisen, daß Stärke auch umhüllt sein muß.

IV. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Abbau im System Diastase-Stärke ohne Seife.

Versuch vom 21. 10. 1929.

Ansatz: 4 ccm Stärke 1%, 2 ccm Puffer $p_H = 8{,}0$; 7,6; 7,0; 6,0, 0,3 ccm Ferment, 1000 fach verdünnt. $t = 6'$.

p_H =	8,0	7,6	7,0	6,0
Restwert der Stärke in mg	32,0	32,0	32,0	31,4

Versuch vom 21. 11. 1929.

Ansatz: Derselbe wie oben, nur Ferment doppelt verdünnt. $t = 6'$.

p_H =	8,0	7,6	7,0	6,0
Restwert der Stärke in mg	1,11	1,3	1,3	1,11

Die Wasserstoffionenkonzentration im Bereich 6,0–8,0 übt also auf die von uns benutzte Diastase keinen sicheren Einfluß aus.

D. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Abbau im System Diastase-Stärke unter Anwesenheit von Seife.

I. Kurze Versuche.

2 Versuche vom 9. 10. 1929.

Ansatz laut Grundanordnung. $t = 10'$.

p_H =	8,0	7,6	7,3	7,0	6,6	6,0	5,0	Kontr. ohne Seife 7,3
Restwert der Stärke in mg	3,6	2,4	3,18	2,16	1,70	1,44	1,70	0,48
Restwert in mg	3,2	2,67	2,58	2,28	2,05	1,74	—	—

Versuch vom 10. 10. 1929.

Derselbe Ansatz. $t = 10'$.

p_H =	8,0	7,6	7,3	7,0	6,6	6,0	5,0	Kontrolle 7,3
Restwert der Stärke in mg	4,4	4,2	4,0	3,6	3,2	2,06	2,6	0,4

Versuch vom 10. 10. 1929.
Derselbe Ansatz, nur 0,5 ccm Ferment und 2,0 ccm Seife ½%. t = 8′.

pH =	8,4	8,0	7,6	7,1	6,7	6,2
Restwert der Stärke in mg	6,0	4,8	4,72	4,4	2,9	1,4

Siehe ferner Kurve im I. Teil.

II. Zeitversuche.

Versuch vom 28. 10. 1929.
Ansatz wie Grundanordnung in doppelter Menge. Endpunkt: helles Braungelb.

pH =	6,0	6,6	7,0	7,3	7,6	8,0
Völliger Abbau der Stärke nach Std.	20½	28½	45¼	72	94	118

Siehe ferner Kurve im I. Teil.
Eine Reihe anderer Versuche verliefen ähnlich.

III. Versuche mit Eiweiß.

Beispiel: Zeitversuch vom 19. 10. 1929.
Ansatz wie Grundanordnung, dazu 0,5 ccm Serum.

Puffer	Kontrolle ohne Serum 6,0	Endpunkt: klares Gelb					
		6,0	6,6	7,0	7,3	7,6	8,0
Völliger Abbau der Stärke nach Std.	22	3h 35′	9¼	16¾	24¼	32¾	41½

IV. Versuche mit Inkreten.

Ansatz wie Grundanordnung + 0,1 ccm Adrenalin, Insulin, Thyroxin; 1,0 Ergetamin dazu Kontrolle ohne Inkret.

Zeit des Abbaus in den Proben mit Inkreten derselbe wie in Kontrolle, außer bei Insulin. Die scheinbar fördernde Wirkung des Insulins ist mit Vorsicht aufzunehmen, da man nicht weiß, wieweit Insulin selbst oder Verunreinigungen wirksam sind.

V. Versuche mit Alkoholen.

Zur Verwendung gelangen isokapilläre Mengen von Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butyl- und Amylalkohol.

Ansatz wie Grundanordung in doppelter Menge dazu 1,95 ccm Methyl-, 0,92 ccm Äthyl-, 0,56 ccm Propyl-, 0,14 ccm Butyl- und 0,05 ccm Amylalkohol. Kontrolle ohne Alkohol.

Eine Reihe von Vorversuchen zeigte, wie auch in der Kurve (Teil I) zu ersehen ist, eine deutliche Förderung des Abbaus, einige davon eine geringe Hemmung bei Methylalkohol, Erklärung siehe im ersten Teil.

2 quantitative Versuche.

Ansatz wie Grundanordnung dazu Äthyl-, Propyl- und Butylalkohol in isokapillären Mengen. 1. t = 10′, 2. t = 8′.

	Alkohole	Äthyl 0,92 ccm	Prophyl 0,56 ccm	Butyl 0,14 ccm	Kontrolle
1. t = 10′	Restwert der Stärke in mg	1,14	1,24	1,10	2,10
2. t = 8′	Restwert der Stärke in mg	1,5	1,5	1,5	2,2

Ferner Kurve im I. Teil.

E. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration im System Diastase-Stärke-Lecithin.

Zu den Lecithinversuchen wird dieselbe Grundanordnung übernommen. Anstelle von Seife tritt eine 1%ige Lecithinemulsion, die nach Porges in folgender Weise hergestellt wird:

0,2 g Lecithin werden in Aceton gelöst (nicht alles Lecithin läßt sich lösen), daher sind die Mengen immer etwas ungenau. Diese Lösung wird tropfenweise in 20 ccm kochenden Wassers eingegeben. Es entsteht eine grauweiße Emulsion, von der wir 0,6 ccm zu unserem Grundansatz hinzugeben.

I. Einige quantitative Versuche.

Ansatz wie oben. $t = 6'$.

Datum	p_H =	8,0	7.6	7.3	7,0	6.6	6.0	Kontrolle 8,0
11. X. 29.	Restwert der Stärke in mg	4,08	3,98	3,67	3,25	6.08	2.76	0,28
12. X. 29.	do.	3,6	3,4	3,0	3,0	2,8	2,4	—
15. X. 29.	do.	3,96	2,31	3,3	2,92	2,33	2,21	—
16. X. 29.	do.	3,74	3,40	2,96	2,89	2,40	2,24	—

Siehe auch Kurve.

II. Zeitversuche.

Ansatz wie oben. 1. Endpunkt: Dextrinfarbe mit Jodjodkali.
2. Endpunkt: Gelbbraune Farbe mit Jodjodkali.

p_H =	6,0	6,6	7,0	7,3	7,6	8,0	Kontrolle 8,0
1. nach Zeit in Std.	8	18	28½	39	51	68	45 Sek.
2. nach Zeit in Std.	22	36½	49	62½	76	99	45 Sek.

Siehe auch Kurve.

Grenze der Lecithinwirkung: Dieselbe Anordnung wie mit Seife (siehe dort). Sie liegt bei einer Verdünnung von 1 : 200000 der 1%igen Lecithinlösung.

III. Versuche mit Lecithin und isokapillären Alkoholen erwiesen sich ganz ähnlich denen mit Seife.

F. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration im System Diastase-Stärke-Galle.

I. Beispiel vom 12. 10. und 16. 10. 1929.

Ansatz: 2 ccm Stärke 1%, 2 ccm Puffer,
1 ccm Ferment vom wäßrigen Extrakt 1 : 50,
2 ccm Natrium choleinicum (Kahlbaum 0,5%).

	p_H =	8,0	7,6	7,35	7,1	6,7	6,2
$t = 5'$	Restwert der Stärke in mg	2,84	2,70	2,30	2,20	1,81	1,53
$t = 7'$	Restwert der Stärke in mg	2,40	2,20	1,98	1,88	1,39	1,15

Versuch vom 24. 10. 1929.

Ansatz laut Grundanordnung mit Natrium choleinicum. t = 8′.

pH =	8,0	7,6	7,3	7,0	6,6	6,0
Restwert der Stärke in mg	0,44	0,42	0,39	0,35	0,23	0,20

Siehe auch Kurven im I. Teil.

II. Beispiel vom 21. 10. 1929.

Ansatz laut Grundanordnung in doppelter Menge. Endpunkt: Braungelb mit Jodjodkali.

pH =	6,0	6,6	7,0	7,3	7,6	8,0	Kontrolle 8,0
Endpunkt erreicht nach Std.	1½	2½	3½	4¾	6	7½	45 Sek.

Siehe auch Kurve.

Versuche mit Natrium cholalicum.

1. Ansatz wie oben mit Natrium cholalicum. t = 6′.

pH =	8,0	7,6	7,3	7,0	6,6	6,0
Restwert der Stärke in mg	0,6	0,55	0,36	0,32	0,22	0,19

Siehe auch Kurve.

2. Ansatz wie oben. Endpunkt: Gelbbraun mit Jodjodkali.

pH =	6,0	6,6	7,0	7,3	7,6	8,0
Endpunkt erreicht nach Std.	1h 20′	2h 10′	3h 10′	4h	4h 50′	6h 20′

G. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das System Diastase-Stärke-Cholesterin.

Herstellung des Cholesterins: 0,2 g in Chloroform gelöst, diese Lösung tropfenweise in 20 ccm kochenden Wassers.

Für quantitative Bestimmung mit unserem Grundansatz werden die Werte zu gering, als daß sie noch genau festgelegt werden könnten, daher nur Beispiel eines Zeitversuchs (26. 10. 1929).

Ansatz wie oben in doppelter Menge mit Cholesterin (1%). Endpunkt: Gelb.

pH =	6,0	6,6	7,0	7,3	7,6	8,0	Kontrolle 8,0
Endpunkt erreicht nach Min.	15	25	40	55	70	95	45 Sek.

H. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das System Diastase-Stärke-Lecithin + Cholesterin.

2 quantitative Versuche (9. 4. 1930).

Ansatz wie Grundanordnung bei Puffer 7,3 mit

1. 0,6 ccm Lecithin,
2. 0,6 ccm Lecithin + 0,6 ccm Cholesterin,
3. 0,6 ccm Cholesterin,
4. Kontrolle ohne Lecithin und Cholesterin.

	Stoff	Lecithin	Lec. + Chol.	Chol.	Kontrolle
t = 7 Min.	Restwert der Stärke in mg	3,42	3,0	0,12	0,03
t = 10 Min.	do.	3,3	2,06	0,06	0,001

Es sei noch vermerkt, daß sich beim Abbau des Caseins durch Pankreatin eine hemmende Wirkung der von uns angewandten oberflächenaktiven Substanzen nicht nachweisen ließ.

Erwähnenswert sind noch Versuche, die wir mit Tetanustoxin in gleicher Richtung anstellten. Als Tetanustoxin verwandten wir ein Präparat Nr. 1086 von den Behringwerken in 1000facher Verdünnung. Wir injizierten in den einen Oberschenkel eines Meerschweinchens 0,25 ccm dieser Lösung + 0,25 ccm Wasser. In den anderen Oberschenkel ebenfalls 0,25 ccm der Toxinlösung + 0,25 ccm 0,5%ige Seifenlösung. Es entwickelte sich regelmäßig am ersteren Bein nach 2 bis 3 Tagen die bekannte lokale Tetanusstarre, am anderen Bein blieb die Starre vollkommen aus. Es ist anzunehmen, daß die Entgiftung des Tetanustoxins durch Seife auf dieselbe Weise erfolgt wie die Inaktivierung der Diastase.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Prof. Dr. Abderhalden für die gütige Überlassung eines Arbeitsplatzes im Physiologischen Institut, sowie Herrn Privatdozent Prof. Dr. Wertheimer für die freundliche Anregung und Leitung der Arbeit aufrichtig zu danken.

Lebenslauf.

Der Verfasser wurde geboren am 4. Februar 1906 zu Mielec (ehemalig Österreich-Ungarn) als Sohn des damaligen Landwirts und Getreidekaufmanns Efraim Mühlbauer und seiner Ehefrau Sabine, geb. Mühlbauer. Er kam 1914 nach Halle a. S., wo er von Ostern 1915 bis Ostern 1917 die Volks-, von Ostern 1917 bis Michaelis 1919 die Mittel- und von Michaelis 1919 an die Städtische Oberrealschule besuchte, die er Ostern 1925 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Er studierte zunächst 2 Semester Landwirtschaft an der Landwirtschaftlichen Hochschule in Halle a. S., arbeitete dreiviertel Jahr praktisch und trat November 1926 zur Medizinischen Fakultät über. Ostern 1928 bestand er in Halle das Physikum. Während seiner Studienzeit hörte er bei den Herren: Abderhalden, Beneke, Brugsch, Clausen, Disselhorst, Eckert-Möbius, Eisler, Gerlach, Gellhorn, Gerhardt, Goebel, Grouven, Grund, Haecker, Hauptmann, Herz, Hett, Horsters, Hülse, Karsten, Klingmüller, Kochmann, Koeppe, Kok, Loeffler, Menzer, Nürnberger, Pietrusky, Pönitz, Roemer, Schaetz, Schmidt, Stieda, Stieve, Voelcker, Volkmann, Vorländer, Walther, Wätjen, Wertheimer, Ziehen.